

RENOVAÇÃO PARCIAL DO MEIO DE CULTURA COMO PERSPECTIVA DE AUMENTAR A EFICIÊNCIA DE UM SISTEMA DE COCULTURA DE EMBRIÕES SEM FLUXO CONTÍNUO DE CO₂

PARTIAL REPLACEMENT OF THE CULTURE MEDIUM IN ORDER TO ENHANCE A EMBRYOS COCULTURE SYSTEM WITHOUT CONTINUOUS CO₂ FLOW

Marcos Antonio Lemos Oliveira¹ Maria Madalena Pessoa Guerra² Benjamin Gaylord Brackett³

RESUMO

Substituindo-se parcialmente (30%) os meios de cultura TCM 199/NaHCO₃ (199/NaHCO₃) e TCM 199/25mM HEPES (199/HEPES) a intervalos de 24, 48 ou 72 horas, testou-se a possibilidade de incrementar a obtenção de blastocistos expandidos (BLE) a partir de embriões *Mus musculus* no estágio de duas células incubados sem fluxo contínuo de CO₂. Após distribuição aleatória dos embriões em tubos de ensaio contendo 2ml de meio de cultura e monocamada celular de oviduto bovino, os referidos tubos foram hermeticamente fechados e colocados em estufa bacteriológica a 37°C durante 96 horas. A renovação do meio de cultura em qualquer período não incrementou a porcentagem de embriões que alcançou o estágio de BLE, todavia, o número total de BLE obtido com o 199/HEPES (79,0%) foi superior ($P \leq 0,01$) ao verificado com o 199/NaHCO₃ (65,0%).

Palavras-chave: cocultura, meio de cultura, embrião.

SUMMARY

It has been evaluated, in a coculture system without continuous CO₂ flow, the possibility to enhance the percentage of blastocysts obtained from two cells mouse embryos by partial (30%) replacement (each 24, 48 and 72 hours of intervals) of two culture media (TCM 199/NaHCO₃ and TCM 199/25 mM HEPES).

The embryos, randomly allocated in closed cultures tubes with 2 ml of medium and bovine oviduct monolayer, were maintained at 37°C during 96 hours. No differences between spreaded blastocysts were verified when the media were replaced at all intervals, however, the medium TCM 199/25mM HEPES was significantly more effective ($P \leq 0.01$) than TCM 199/NaHCO₃.

Key words: coculture, culture medium, embryo.

INTRODUÇÃO

A fecundação *in vitro*, por ser uma técnica com potencial de fornecer um número de estruturas, tanto para estudos quanto para fins comerciais, consideravelmente maior do que simples programas de superovulação, é responsável por substanciais avanços nas pesquisas sobre produção de clones, produção de animais transgênicos e determinação prévia do sexo. Entretanto, a viabilização desse tipo de tecnologia depende fundamentalmente de um sistema de cocultura eficiente que simule um ambiente atmosférico compatível com o materno para favorecer o processo de clivagem sem prejuízo da qualidade embrionária.

¹Médico Veterinário, MsC, Dr, Professor Adjunto, Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. D. Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE. Autor para correspondência.

²Médico Veterinário, MsC, Professora Assistente, DMV, UFRPE. Médico Veterinário, MsC, Professora Assistente, DMV, UFRPE.

³DVM, PhD, Professor, Department of Physiology and Pharmacology. College of Veterinary Medicine of the Georgia University, Athens, Georgia, 30602-7389, USA.

Por conter a maioria das substâncias nutritivas indispensáveis ao desenvolvimento *in vitro* de embriões mamíferos, diversos meios de cultura vêm sendo testados para atender às exigências metabólicas do embrião em todas as etapas de seu desenvolvimento (BRACKETT *et al.*, 1989; PEREIRA, 1991; GUERRA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1992c). Apesar da renovação parcial do meio ser uma prática de rotina em alguns laboratórios onde é controlado o nível de CO₂ (BRACKETT *et al.*, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 1991ab; YOUNIS *et al.*, 1991), em outros, nos quais o ambiente atmosférico da cocultura é resultante do próprio metabolismo celular (PEREIRA, 1991; RIBEIRO, 1991; GUERRA, 1992; GUERRA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1992a), essa metodologia, exceção feita aos trabalhos de GUERRA *et al.* (1992) e OLIVEIRA *et al.* (1992b), vem sendo empregada sem renovação do meio de cultura.

Este trabalho, por fazer parte de uma linha de pesquisa que objetiva minimizar a problemática da cocultura de embriões através de um sistema sem adição externa de CO₂ para viabilizar sua utilização a nível de campo, foi conduzido com a finalidade de incrementar a obtenção de blastocistos expandidos da espécie *Mus musculus* através da substituição parcial de dois meios de cultura TCM 199/NaHCO₃ (199/NaHCO₃) e TCM 199/25 mM HEPES (199/HEPES) a intervalos de 24, 48 ou 72 horas, utilizando-se as células de oviduto bovino como a monocamada celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se 502 embriões *Mus musculus* no estágio de duas células, os quais após seleção e classificação, conforme caracteres morfológicos sugeridos por STRINGFELLOW *et al.* (1987), foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos experimentais com seis replicações (cada período de substituição foi constituído por dois grupos representados pelos meios de cultura). Os tubos de ensaio, contendo 2ml de meio de cultura, monocamada celular e máximo de dez embriões, foram hermeticamente fechados e colocados em estufa bacteriológica^a a 37° C durante 96 horas, período em que, diariamente, eram efetuadas as avaliações de desenvolvimento e qualidade embrionária, assim como a substituição de 30% do meio de cultura a cada 24, 48 ou 72 horas.

A monocamada de células de oviduto bovino foi preparada modificando-se a técnica empregada por SOTO-BELLOZO *et al.* (1976). Os ovidutos, assepticamente removidos em matadouro, foram transportados em um becker contendo 50ml de Tampão Fosfato Salino e, posteriormente, submetidos a sucessivas lavagens em placas de Petri contendo a referida solução. Após abertura longitudinal dos ovidutos, procedeu-se a raspagem das células epiteliais, as quais foram centrifugadas três vezes a 100rpm durante 15 minutos. Após a eliminação do sobrenadante, as células foram mais uma vez suspensas no Meio Mínimo Essencial^b modificado contendo 10% de soro fetal bovino^c (SFB) e, posteriormente, semeadas em garrafas de cultivo em estufa bacteriológica a 37°C. No terceiro dia, substituiu-se o meio e novamente foram incubadas até que a monocamada celular atingisse 100% de confluência. No 14° dia, efetuou-se a primeira passagem com suspensão destas células através da tripsinização da monocamada e diluição de 1:3 acrescido de 10% de SFB. A preparação dos tubos de cultivo, realizada a partir da quarta passagem celular, foi efetuada colocando-se 1ml da suspensão e após vedação, próxima ao bico de Bunsen, os referidos tubos foram mantidos em estufa bacteriológica a 37°C. Esta preparação foi sempre realizada com 24 horas de antecedência da cocultura embrionária para permitir 100% de confluência da camada celular.

Os meios de cultura (Tabela 1) 199/NaHCO₃^d e 199/HEPES^d, com pH ajustado para 7,4, foram preparados conforme BRACKETT *et al.* (1989), ressaltando-se que foi modificada, de 10 para 20%, a porcentagem de suplementação do meio 199/NaHCO₃.

Tabela 1. Constituição dos meios de cultura segundo BRACKETT *et al.* (1989).

Constituintes	199/NaHCO ₃	199/HEPES	Fonte
199/NaHCO ₃	4,95g	-	Sigma Chemical Co/USA
199/HEPES	-	7,50g	Sigma Chemical Co/USA
Piruvato de sódio	0,025g	0,030g	Sigma Chemical Co/USA
NaHCO ₃	1,30g	1,10g	Sigma Chemical Co/USA
Glucose	2,75g	-	Sigma Chemical Co/USA
Sulfato de Estreptomicina	0,025g	0,015g	Fontoura-Wyeth/BR
Penicilina G Potássica	1000UI/ml	1000UI/ml	Fontoura-Wyeth/BR
Soro fetal bovino	20%	20%	Cultilab/BR
H ₂ O tridestilada/deionizada	500ml	500ml	

Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, arranjo fatorial de acordo com SILVA & SILVA (1982), para a análise estatística dos dados. Os valores percentuais foram transformados em

$$\text{arc. sen. } \sqrt{y/100}$$

onde y é a variável resposta e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando-se o nível de 1% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho encontram-se expressos na Tabela 2, através da qual pode-se inicialmente constatar que a substituição parcial do meio de cultura não favoreceu significativamente o desenvolvimento embrionário. Esperava-se que a renovação a cada 24 horas apresentasse o melhor desempenho em função da constante reposição de nutrientes indispensáveis ao metabolismo do embrião e, por sua vez, que a substituição do meio a intervalos de 48 horas fosse superior aquela de 72 horas, todavia, o número de estruturas que alcançou o estágio de blastocisto expandido foi similar para os três períodos. É provável que a renovação parcial do meio de cultura a intervalo de 24 horas, utilizada por BRACKETT *et al.* (1989), YOUNIS *et al.* (1989), OLIVEIRA *et al.* (1991ab) e YOUNIS *et al.* (1991), seja interessante para sistemas que permitem controlar o ambiente atmosférico da cocultura embrionária. Naqueles onde o CO₂ é proveniente do próprio metabolismo celular, a queda de seu nível, quando da abertura do tubo de ensaio para

renovação do meio, por não ser facilmente recuperada, pode determinar modificações muito bruscas do pH do meio de cultura e dessa forma comprometer o desenvolvimento embrionário, o qual pode ser também comprometido devido a uma contaminação adquirida no momento da abertura do já referido tubo de ensaio.

Trabalhando com um sistema de cocultura semelhante ao desta pesquisa, GUERRA *et al.* (1992) registraram um número significativamente maior de embriões degenerados quando a substituição do meio 199/NaHCO₃ foi efetuada a intervalos de 24 horas. Este resultado não foi corroborado neste experimento em consequência de não se ter verificado diferença estatística entre os intervalos de substituição tanto no 199/NaHCO₃ quanto no 199/HEPES e mesmo que houvesse sido registrada diferença significativa entre os três períodos de substituição, o de 24 horas teria apresentado o menor índice de embriões degenerados. É possível que a diferença entre os dados deste trabalho e os constatados por GUERRA *et al.* (1992) seja em decorrência do tipo de monocamada celular utilizada, pois, enquanto nesta pesquisa elegeu-se a monocamada celular de origem primária, GUERRA *et al.* (1992) lançaram mão da monocamada celular de linhagem contínua (células "Madin and Darby bovine kidney" - MDBK), tipo de monocamada que BIGGERS *et al.* (1957) não recomendaram sua utilização na cocultura de embriões por sofrerem alterações químicas e morfológicas em sua estrutura e por não apresentarem especificidade celular. Em se tratando de embriões no estágio de duas células, eles estariam, *in vivo*, no oviduto e, conseqüentemente, devem ter sofrido, mesmo *in vitro*, benéfica influência das secreções da monocamada celular de oviduto

Tabela 2. Médias originais de desenvolvimento embrionário desde o estágio de duas células até o de blastocisto expandido após 96 horas de incubação a 37°C em cocultura com diferentes meios e monocamada celular de oviduto.

Meio de Cultura	Renovação do Meio de Cultura															
	24 horas				48 horas				72 horas				Total			
	Blastocisto		Degenerado		Blastocisto		Degenerado		Blastocisto		Degenerado		Blastocisto		Degenerado	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
199/NaHCO ₃	62	73,8	22	26,2	54	63,5	31	36,5	49	57,6	36	42,4	165	65,0 ^a	89	35,0
199/HEPES	69	85,2	12	14,8	66	79,5	17	20,5	61	72,6	23	27,4	196	79,0 ^b	52	21,0
Total	131	79,4	34	20,6	120	71,4	48	28,6	110	65,1	59	34,9	361	71,9	141	28,1

ab = P ≤ 0,01.

que impediu ocorrer degeneração em um número extremamente elevado de embriões nos três intervalos de substituição do meio. Essa teoria da especificidade celular, apesar de não respaldada por PEREIRA (1991) e RIBEIRO (1991) que trabalharam com embriões em estádios bem mais avançados de desenvolvimento, foi previamente relatada por REXROAD JR. (1986), REXROAD JR. & POWELL (1988), GANDOLFI & MOOR (1987), REXROAD JR. (1989), WIEMER *et al.* (1989) e respaldada por OLIVEIRA *et al.* (1992a) quando constataram desempenho estatisticamente significativo da monocamada celular de origem primária em relação à de linhagem contínua e concluíram que em se tratando de embriões no estágio de duas células, é aconselhável que se utilize monocamada de células de oviduto em detrimento da monocamada de células MDBK.

Comparando o total de embriões que atingiu o estágio de blastocisto expandido em função do meio de cultura, observa-se que a porcentagem obtida com o 199/HEPES (79,0%) foi estatisticamente superior àquela registrada com o 199/NaHCO₃ (65,0%), achado que pode ter sido consequência do 199/HEPES possuir maior capacidade tampão do que o 199/NaHCO₃, pois, além de conter o bicarbonato de sódio em sua constituição, possui, adicionalmente, o HEPES que é uma substância com propriedade de tamponamento e, por isso mesmo, deve ter equilibrado o pH dentro de níveis desejáveis sem necessitar da adição externa de CO₂ conforme referiu-se KANE (1987). Na cocultura de embriões bovinos e de camundongos, BRACKETT *et al.* (1989) e GUERRA (1992) também registraram melhor desempenho do 199/HEPES.

O processo de seleção dos embriões com base nas características morfológicas, a utilização de água tridestilada/deionizada para preparação dos meios, a adição de proteína para minimizar a problemática da presença de substâncias tóxicas existentes no meio de cultura, o uso do substrato energético adequado para embriões em estágio inicial de desenvolvimento e o pH ajustado para um valor equivalente a 7,4, respectivamente, sugeridos por STRINGFELLOW *et al.* (1987), WHITTINGHAM (1971), PIKE & ALIKANI (1988), KAYE (1988) e BRACKETT *et al.* (1989) foram determinantes para que os resultados aqui obtidos, especialmente com o meio 199/HEPES, fossem considerados como bastante satisfatórios. Esse tipo de análise foi elaborada após se ter constatado que a porcentagem de embriões que atingiu o estágio de blastocisto expandido não foi expressivamente inferior aquela verificada por PEREIRA (1991) e PEREIRA *et al.* (1991) que

utilizaram estruturas em estágio mais avançado de desenvolvimento (oito células) e mostrou-se similar aos achados de GUERRA (1992), GUERRA *et al.* (1992) e OLIVEIRA *et al.* (1992b) que trabalharam com embriões em igual fase de desenvolvimento à utilizada neste trabalho.

Com base nos resultados estatísticos, conclui-se não existir necessidade de renovar parcialmente o meio de cultura antes do prazo de 72 horas de incubação em consequência de não incrementar de forma substancial a eficiência do sistema de cocultura de embriões sem fluxo contínuo de CO₂, todavia, recomenda-se a utilização do meio de cultura 199/HEPES pela sua eficiência em incrementar a porcentagem de desenvolvimento de embriões em fase de pré-implantação.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - Fabbe, Primar - Br.
- b - Interlab/Flow - Br.
- c - Cultilab - Br.
- d - Sigma Chemical Co. - USA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIGGERS, J.D., RINALDINI, L.M., WEEB, M. The study of growth factors in tissue culture. *Symposia of the Experimental Biology*, p. 264-297, 1957.
- BRACKETT, B.G., YOUNIS, A.I., FAYRER-HOSKEN, R. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertility and Sterility*, v. 52, p. 319-324, 1989.
- GANDOLFI, F., MOOR, R. M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 81, p. 23-28, 1987.
- GUERRA, M. M. P. **Obtenção *in vitro* de mórulas e blastocistos a partir de embriões murinos com duas células.** Recife 70 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Mestrado em Clínica da Reprodução, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1992.
- GUERRA, M. M. P., OLIVEIRA, M.A.L., LIMA, P.F. Influência da substituição parcial do meio de cultura sobre a obtenção *in vitro* de mórulas de camundongos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1992, Curitiba, PR. *Anais...* Curitiba, Sociedade Paranaense de Medicina Veterinária, 1992. p. 29.
- KANE, M.T. Culture media and culture of early embryos. *Theriogenology*, v. 27, n. 1, p. 49-57, 1987.
- KAYE, P.L. Metabolic aspects of the physiology of the preimplantation embryo. In: ROSSANT, J.; PEDERSEN, R. A. **Experimental approaches to mammalian embryonic development.** Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 267-292.

- OLIVEIRA, M.A.L., GUERRA, M.M.P., HOLANDA, G.M.L. Utilização de monocamadas de células "Madin and Darby Bovine Kidney" e oviduto como forma de avaliar a especificidade celular na cocultura de embriões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1992. Curitiba, PR. *Anais...* Curitiba, Sociedade Paranaense de Medicina Veterinária, 1992a. p. 26.
- OLIVEIRA, M.A.L., GUERRA, M.M.P., WISCHRAL, A. Substituição parcial do meio de cultura como perspectiva de incrementar a obtenção de blastocistos murinos no sistema fechado de cocultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1992. Curitiba, PR. *Anais...* Curitiba, Sociedade Paranaense de Medicina Veterinária, 1992b. p. 25.
- OLIVEIRA, M.A.L.; PEREIRA, R.J.T.A.; WISCHRAL, A.; *et al.* Influência do meio de cultura sobre a eclosão de embriões murídeos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1992, Curitiba. *Anais...* Sociedade Paranaense de Medicina Veterinária, 1992c. p. 27
- OLIVEIRA, M.A.L., WOOTEN, A., YOUNIS, A.I., BRACKETT, B.G. Nova perspectiva da cultura e cocultura de embriões bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1991. Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991a, v.2, p. 302.
- OLIVEIRA, M.A.L., WOOTEN, A., YOUNIS, A.I., BRACKETT, B.G. Nova perspectiva da fertilização *in vitro* de ovócitos bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1991. Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991b, v.2, p. 303.
- PEREIRA, R.J.T.A. **Influência da monocamada celular e do meio de cultura sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões murinos de oito células.** Recife, 1991. 61 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Mestrado em Clínica da Reprodução, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1991.
- PEREIRA, R.J.T.A., OLIVEIRA, M.A.L., ALVES, J.D.R., LIMA, P.F. Novo método de cocultura para embriões murinos de oito células. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1991. Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991, v.2, p. 301.
- PIKE, I.L., ALIKANI, M. Time-dependent loss of developmental potential when two-celled mouse embryos were retained in culture in excised oviducts. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 514, p. 419-423, 1988.
- REXROAD JR., C.E. Coculture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, v. 31, n.1, p.105-114, 1989.
- REXROAD JR., C.E. Co-culture of sheep and cells from sheep oviduct. *Theriogenology*, v.25, n.1, p.187, 1986.
- REXROAD JR., C.E., POWELL, A.M. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. *Journal of Animal Science*, v. 66, p. 947-953, 1989.
- RIBEIRO, V.M.F. **Cultivo de embriões murinos em monocamadas celulares e em meio suplementado com soro fetal bovino.** Recife, 1990. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Mestrado em Clínica da Reprodução, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1991.
- SILVA, J. A., SILVA, I. P. **Estatística experimental aplicada à ciência florestal.** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1982. 294 p.
- SOTO-BELOZO, E.R., ARCHBALD, L.F., ZEMJANIS, R. Development of a cell culture line of bovine fetal endometrial cells. *American Journal of Veterinary Research*, v. 37, n. 9, p. 1103-1105, 1976.
- STRINGFELLOW, D.A., THOMSON, M.S., RIDDEL, K.P. Morphological bovine embryo. *Alburn Veterinarian*, v. 42, n. 2, p. 6-10, 1987.
- WHITTINGHAM, W. K. Culture of mouse ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, suppl. 14, p. 7-21, 1971.
- WIEMER, K. E., COHEN, J., WIKWN, S.R., *et al.* Co-culture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblast: embryonic morphology and implantation. *Fertility and Sterility*, v. 52, p. 503-508, 1989.
- YOUNIS, A. I., BRACKETT, B. G., FAYRER-HOSKEN, R. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research*, v. 23, p. 189-201, 1989.
- YOUNIS, A. I., ZUELKE, K., HARPER, K. M., *et al.* *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 44, n. 6, p. 1177-1182, 1991.